

INAKTIVASI ENZIMATIS PADA PRODUKSI LINAMARIN DARI DAUN SINGKONG SEBAGAI SENYAWA ANTI NEOPLASTIK

I. Hartati

e-mail: indah_hartati@yahoo.com

L. Kurniasari

e-mail: Laeli_kurniasari@yahoo.com

Jurusan Teknik Kimia
Fakultas Teknik
Universitas Wahid Hasyim
Semarang
Jl Menoreh Tengah X/22
Semarang

M. E. Yulianto

D3 Teknik Kimia
Fakultas Teknik
Universitas Diponegoro Semarang
Jl Prof. Sudarto, S.H.
Kampus Tembalang Semarang

Singkong juga dikenal sebagai ketela pohon atau ubi kayu merupakan salah satu sumber bahan pangan terpenting di negara-negara tropis dan negara berkembang. Saat ini Indonesia termasuk sebagai negara penghasil singkong terbesar ketiga di dunia. Singkong merupakan tanaman yang memiliki kandungan senyawa cyanogen. Senyawa cyanogen pada tanaman singkong berupa senyawa glukosida cyanogen yang terdiri dari linamarin dan lotaustralin. Senyawa glukosida cyanogenik pada tanaman singkong sebagian besar terakumulasi pada daun, batang dan kulit umbinya. Senyawa glukosida cyanogenik, dengan adanya enzim linamarase (β glukosidase), akan terhidrolisa menjadi acetocyanohidrin. Selanjutnya cyanohidrin akan terurai menjadi hidrogen cyanida. Linamarin memiliki sifat-sifat yang dapat menjadikannya sebagai kandidat yang baik sebagai senyawa antineoplastik (antikanker). Linamarin disebut juga sebagai nitrilosida yang memiliki kandungan vitamin B₁₇ yang diharapkan pada proses hidrolisis dapat menghasilkan senyawa cytotoksik yakni HCN. Sel neoplastik (sel kanker) yang kekurangan akan enzim detoksifikasi tetapi kaya akan enzim hidrolase akan terpapar terhadap efek lethal dari cyanida yang dilepaskan oleh linamarin. Seiring dengan meningkatnya peran senyawa fitokimia dalam industri farmasi, dan mengingat ketersediaan bahan baku yang melimpah serta potensi linamarin sebagai senyawa antineoplastik, perlu dikembangkan proses produksi linamarin dari daun singkong sebagai salah satu upaya diversifikasi produk tanaman singkong dan pengadaan senyawa aktif bagi industri farmasi. Linamarin dapat diproduksi melalui proses inaktivasi enzim linamarase dan proses ekstraksi menggunakan ekstraktor inaktivasi enzim dengan solvent asam. Solven berupa larutan asam akan berfungsi ganda, menginaktivasi enzim sekaligus mengekstrak linamarin. Proses inaktivasi enzim menggunakan solvent asam diketahui memiliki beberapa keuntungan, yaitu: proses ini meringkas proses inaktivasi dan ekstraksi sekaligus serta yield yang dihasilkan lebih tinggi karena linamarin diharapkan tidak terkonversi menjadi acetocyanohid enzimatis.

Kata Kunci: anti neoplastik; daun singkong; inaktivasi; linamarin

Pendahuluan

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan pohon tahunan tropika dan subtropika dari keluarga Euphorbiaceae. Singkong juga dikenal sebagai ketela pohon atau ubi kayu. Kemampuan tanaman singkong untuk bertahan hidup pada daerah dan kondisi iklim yang sulit menjadikan singkong sebagai salah satu sumber bahan pangan terpenting di negara-negara tropis dan negara berkembang. Potensi produksi singkong (kalori perhektar pertahun) merupakan yang tertinggi diantara tanaman tropis lainnya (deVries dkk., 1967).

Produksi tanaman singkong di Indonesia mencapai 13 juta ton pada tahun 2007. Indonesia termasuk sebagai negara penghasil singkong terbesar ketiga setelah Brazil dan Thailand serta disusul negara-negara seperti Nigeria dan India (Bigcassava.com, 2007).

Potensi pengembangan tanaman singkong di Indonesia sangat luas mengingat lahan yang tersedia untuk budidaya ubi kayu cukup luas terutama dalam bentuk lahan di dataran rendah serta lahan-lahan di dataran tinggi dekat kawasan hutan.

Umbi singkong dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran. Saat ini di Indonesia umbi singkong selain digunakan sebagai bahan baku pembuatan tepung tapioka, singkong juga dikembangkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Namun demikian hingga kini belum ada upaya pemanfaatan bagian-bagian lain dari tanaman singkong seperti daun, batang ataupun kulit umbi. Oleh karenanya perlu telaah dan pengembangan lebih lanjut terhadap upaya diversifikasi produk dari tanaman singkong.

Singkong merupakan tanaman yang memiliki kandungan senyawa cyanogen. Senyawa cyanogen pada tanaman singkong berupa senyawa glukosida

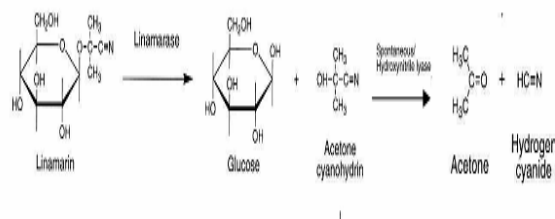
cyanogen yang terdiri dari linamarin (2-β-D-glucopyranosyloxy-2-methylpropanenitrile) dan lotaustralin ((2R)-2-β-D-glucopyranosyloxy-2-methylbutyronitrile). Linamarin merupakan turunan dari valine sedangkan lotaustralin merupakan turunan dari isoleucin (Peifan, 2002). Rasio linamarin dan lotaustralin pada daun dan umbii singkong adalah sekitar 93:7. Senyawa glukosida cyanogenik pada tanaman singkong sebagian besar terakumulasi pada daun, batang dan kulit umbinya (de Bruijn, 1973).

Varietas singkong yang berbeda menunjukkan perbedaan kandungan linamarin, yang berkisar antara 25-450 ug ekvalen cyanida/g. Diduga hal tersebut dikarenakan perbedaan laju biosintesis, degradasi dan laju transport (Elias dkk, 1997) serta perbedaan kondisi lingkungan dan cara budidaya tanaman singkong (Bradbury, 1991).

Senyawa glukosida cyanogenik, dengan adanya enzim linamarase (β glukosidase), akan terhidrolisa menjadi acetocyanohidrin. Selanjutnya cyanohidrin akan terurai menjadi hidrogen cyanida. Diduga mekanisme tersebut digunakan oleh tanaman singkong dan beberapa tanaman lain seperti sorghum, almond dan kacang lima untuk mengusir predator (Haque, 2003), mengingat hydrogen cyanida merupakan senyawa yang bersifat toksik bagi struktur mahluk hidup. Hydrogen cyanida dapat mengurangi ketersediaan energi pada semua sel, dan efeknya akan terasa terutama pada sistem pernafasan dan jantung. Pada beberapa kasus konsumsi singkong dengan kandungan senyawa cyanida yang tinggi dapat menyebabkan keracunan hingga kematian (Akintonwa, 1994).

Proses hidrolisa linamarin oleh enzim linamarase terutama terjadi akibat proses mekanis (proses persiapan bahan baku) atau akibat aktivitas mikrobial (proses fermentasi). Hidrolisa linamarin (Gambar 1) terdiri dari dua tahap reaksi yang melibatkan pembentukan senyawa intermediate, yakni acetonecyanohidrin, yang selanjutnya secara spontan atau oleh aksi dari enzim hydroxynitrilelyase akan membentuk acetone dan hidrogen cyanida (Yeoh dkk, 1998).

Linamarin memiliki sifat-sifat yang dapat menjadikannya sebagai kandidat yang baik sebagai senyawa antineoplastik (antikanker). Linamarin disebut juga sebagai nitrilosida yang memiliki kandungan vitamin B₁₇ yang diharapkan pada proses hidrolisis dapat menghasilkan senyawa cytotoksik yakni HCN. Sel neoplastik (sel kanker) yang kekurangan akan enzim detoksifikasi (rhodenase) tetapi kaya akan enzim hidrolase akan terpapar terhadap efek lethal dari cyanida yang dilepaskan oleh linamarin.



Gambar 1. Reaksi Pembentukan Hidrogen Cyanida dari Linamarin

Seiring dengan meningkatnya peran senyawa fitokimia dalam industri farmasi, maka semakin meningkat pula usaha identifikasi, isolasi dan produksi senyawa fitokimia. Mengingat ketersediaan bahan baku yang melimpah serta potensi linamarin sebagai senyawa antineoplastik, maka perlu dikembangkan proses produksi linamarin dari daun singkong sebagai salah satu upaya diversifikasi produk tanaman singkong dan pengadaan senyawa aktif bagi industri farmasi.

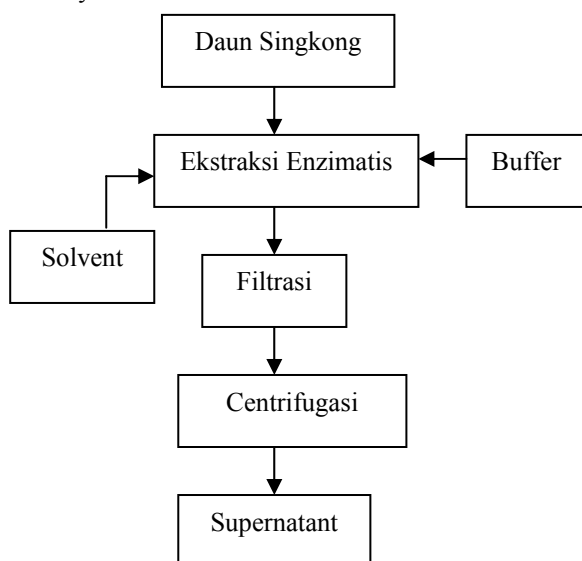
Namun demikian saat ini belum ada metode pengambilan linamarin dari tanaman singkong yang efektif. Kesulitan yang dialami dalam proses pengambilan linamarin adalah kenyataan bahwa selama proses ekstraksi, dengan rusaknya jaringan, maka gaultherin akan dengan segera terhidrolisa menjadi komponen-komponen individualnya yakni acetocyanohidrin dan glukosa. Proses hidrolisa tersebut diyakini dikatalisis oleh enzim yang terdapat dalam tanaman itu sendiri yakni linamarase.

Untuk mengatasi hal ini, perlu dicari cara guna mengekstraksi linamarin dari tanaman pada kondisi dimana aktivitas linamarase minimal atau bahkan hilang. Dengan demikian reaksi hidrolisa linamarin menjadi acetocyanohidrin dan glukosa tidak akan terjadi.

Beberapa metode pengambilan linamarin yang pernah dilakukan antara lain, ekstraksi linamarin menggunakan solvent organik (King dan Bradbury, 1995). Penggunaan solvent organik (aseton) dan proses pemurnian menggunakan evaporator rotary mengakibatkan yield linamarin yang dihasilkan kecil. Diduga hal tersebut dikarenakan pada penggunaan aseton, ada enzim linamarase yang ikut terekstrak. Metode yang lebih sederhana adalah ekstraksi menggunakan air. Namun pada larutan netral, proses hidrolisis masih dapat terjadi.

Alternatif proses produksi linamarin dari daun singkong adalah proses produksi linamarin melalui teknologi penginaktifan enzim linamarase dan proses ekstraksi menggunakan ekstraktor inaktivasi enzim dengan solvent asam (Gambar 1). Enzim linamarase diketahui Solvet berupa larutan asam akan berfungsi ganda, menginaktivasi enzim sekaligus mengekstrak linamarin. Solvent yang akan digunakan adalah asam klorida. Proses inaktivasi enzim menggunakan solvent asam (asam klorida) memiliki beberapa keuntungan, yaitu: proses ini meringkas dua proses sekaligus,

yakni proses inaktivasi enzim linamarase dan proses ekstraksi, yield yang dihasilkan lebih tinggi karena linamarin diharapkan tidak terkonversi menjadi acetocyanohidrin.



Gambar 1. Diagram Proses Ekstraksi Linamarin

Singkong

Singkong, yang juga dikenal sebagai ketela pohon atau ubi kayu, dalam bahasa Inggris bernama cassava, adalah pohon tahunan tropika dan subtropika dari keluarga Euphorbiaceae. Umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran.

Singkong merupakan umbi atau akar pohon yang panjang dengan fisik rata-rata bergaris tengah 2-3 cm dan panjang 50-80 cm, tergantung dari jenis singkong yang ditanam. Daging umbinya berwarna putih atau kekuning-kuningan. Umbi singkong tidak tahan simpan meskipun ditempatkan di lemari pendingin. Gejala kerusakan ditandai dengan keluarnya warna biru gelap akibat terbentuknya asam sianida yang bersifat racun bagi manusia. Umbi singkong merupakan sumber energi yang kaya karbohidrat namun sangat miskin protein. Sumber protein yang bagus justru terdapat pada daun singkong karena mengandung asam amino metionin. Jenis singkong *Manihot esculenta* pertama kali dikenal di Amerika Selatan kemudian dikembangkan pada masa pra-sejarah di Brasil dan Paraguay. Bentuk-bentuk modern dari spesies yang telah dibudidayakan dapat ditemukan bertumbuh liar di Brasil selatan. Meskipun spesies *Manihot* yang liar ada banyak, semua varietas *M. esculenta* dapat dibudidayakan. Produksi singkong dunia diperkirakan mencapai 184 juta ton pada tahun 2002. Sebagian besar produksi dihasilkan di Afrika 99,1 juta ton dan 33,2 juta ton di Amerika Latin dan Kepulauan Karibia.

Singkong ditanam secara komersial di wilayah Indonesia (waktu itu Hindia Belanda) pada sekitar tahun 1810 [1], setelah sebelumnya diperkenalkan

orang Portugis pada abad ke-16 ke Nusantara dari Brasil.

Ubi kayu (*manihot esculenta* crant) merupakan salah satu bahan pangan yang utama, tidak saja di Indonesia tetapi juga di dunia. Di Indonesia, ubi kayu merupakan makanan pokok ke tiga setelah padi-padian dan jagung. Sedangkan untuk konsumsi penduduk dunia, khususnya penduduk negara-negara tropis, tiap tahun diproduksi sekitar 300 juta ton ubi kayu (Rukmana, 1997 dalam Simanjuntak, 2002).

Departemen pertanian RI memproyeksikan produksi ubi kayu tahun 2000 mencapai 18,56 ton dengan tingkat permintaan sebesar 23,32 ton sehingga masih terdapat kekurangan sebesar 4, 67 ton. Disamping itu, hasil olahan ubi kayu (gaplek dan tepung tapioka) juga diperlukan dalam berbagai industri (industri pakan, tekstil, kertas, perekat dan farmasi).

Klasifikasi Tanaman Singkong

| | |
|-----------|-----------------------|
| Kerajaan | : Plantae |
| Divisi | : Magnoliophyta |
| Kelas | : Magnoliopsida |
| Ordo | : Malphigiales |
| Famili | : Euphorbiaceae |
| Subfamili | : Crotonoideae |
| Bangsa | : Manihoteae |
| Genus | : Manihot |
| Spesies | : <i>M. esculenta</i> |

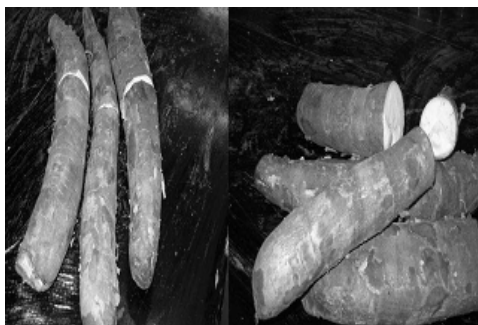
Singkong Sebagai Tanaman Cyanogenik

Singkong (Gambar 2) adalah tanaman cyanogenik yang mengandung dua jenis glukosida cyanogens yakni linamarin ($2\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyloxy-2-methylpropanenitrile}$) dan lotaustralin $[(2R)\text{-}2\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyloxy-2-methylbutyronitrile}]$ yang diturunkan dari valine dan isoleusin ((Peifan et al., 2004; Koch et al., 1992). Rasio linamarin dan lotaustralin pada daun dan akar tanaman singkong kurang lebih 93:7 (Liangcheng et al., 1995). Walaupun komponen-komponen tersebut dilaporkan dijumpai di semua jaringan tanaman singkong dengan kandungan linamarin yang bervariasi pada jaringan tanaman yang berbeda, namun daun, batang dan kulit umbi memiliki kandungan senyawa glukosida yang lebih tinggi dibandingkan pada umbi singkong.



Gambar 2. Tanaman Singkong

Varietas singkong yang berbeda menunjukkan kandungan senyawa glukosida yang berbeda pula. Kandungan linamarin bervariasi antara 25-450 ug ekvalent cyanide/g. Perbedaan tersebut diduga disebabkan perbedaan laju biosynthesis, degradasi atau transport (Elias dkk, 1997). Faktor lingkungan, cara tanam dan kondisi tumbuh juga memberikan pengaruh pada kandungan senyawa cyanogen tanaman singkong ((Cooke, 1978; Bradbury et al., 1991).



Gambar 3. Umbi Singkong

Translokasi linamarin berlangsung dari daun ke akar (Nambisan and Sandaresan, 1994). Santana dkk (2002) menyatakan bahwa pada sintesis linamarin singkong, senyawa cyanoglikosida terakumulasi pada akar dan disintesa di pucuk daun dan ditransportasikan ke akar dimana senyawa tersebut akan disimpan. Hal yang berkebalikan dinyatakan oleh Elias dkk (1997) yang menyatakan bahwa tidak ada akumulasi linamarin pada umbi tanaman singkong (Gambar 3), yang mengindikasikan bahwa linamarin tidak disimpan pada umbi melainkan linamarin terus digunakan dan terus mobil (bergerak).

Cyanogenisiti Singkong (Hidrolisa Linamarin)

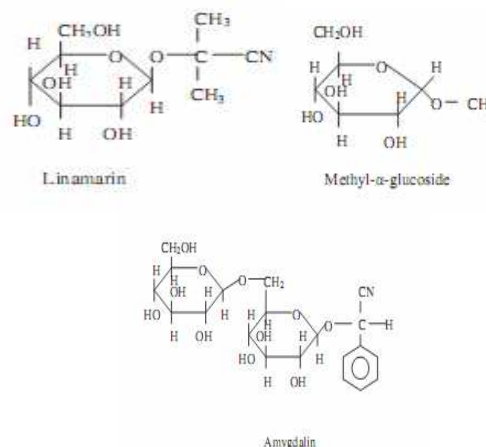
Tanaman singkong selain mengandung senyawa cyanogenik, jaringan tanaman singkong juga mengandung suatu enzyme hidrolase yang dikenal sebagai linamarase (β glukosidase). Ketika jaringan akar singkong rusak, terutama oleh perlakuan mekanik (proses persiapan bahan baku atau proses persiapan produk) atau oleh aktivitas microbial (proses fermentasi), enzim linamarase kontak dengan linamarin, akibatnya linamarin akan terhidrolisa dan melepaskan hydrogen cyanide (Yeoh, 1998). Hidrolisis linamarin melibatkan dua tahapan reaksi yakni pembentukan senyawa intermediate acetocyanohydrin, yang akan secara spontan terurai atau oleh aksi enzim hydroxynitrilase membentuk acetone dan hydrogen cyanide (Yeoh, 1998).

Pada dasarnya, linamarin tidak beracun dan sepe[etinya linamarin merupakan sumber cyanide pada tubuh manusia (Mingi dkk, 1992). Beberapa penelitian menyatakan bahwa linamarin yang terdapat pada produk-produk dari singkong dapat melewati proses metabolisme pada tubuh manusia tanpa ada perubahan terhadap strukturnya selama 24 jam dan dikeluarkan dari tubuh melalui sekresi urin (Brimer and Roseling,

1993; Carlson et al., 1995). Sejak tahun 1891 telah diketahui bahwa linamarin merupakan factor agravasi pada defisiensi iodine yang mengakibatkan terjadinya malnutrisi. Sebagai senyawa cyanoglikosida, linamarin secara kimia dikaitkan dengan amygladin (laetrile) walaupun keduanya berbeda berat molekulnya. Linamarin belum pernah digunakan pada terapi kanker di Amerika Serikat. Namun demikian amygladin dan linamarin yang diekstrak dari biji almond, apricot, peach (Nahrstedt, 1987), dan ekstrak singkong (Yeoh, 1998) telah digunakan dalam pengobatan kanker dan telah dikenal lama dalam sejarah pengobatan cina (Lyuke, 2004)

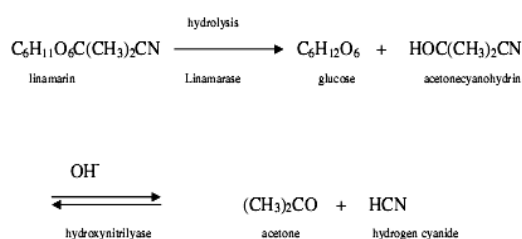
Linamarin Sebagai Nitriloside

Linamarin termasuk dalam kelas yang dikenal sebagai beta-cyanogenetic glucosides. Termasuk juga didalamnya glukosida yang lain seperti amygladin, prunasin dan dhurrin. Linamarin juga dikenal sebagai nitriloside (Krebs Jr, 1970). Senyawa senyawa tersebut didefinisikan sebagai senyawa yang larut dalam air, tidak beracun, dan senyawa bergula yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Banyak diantara senyawa glukosida (Gambar 4) tersebut yang dapat dimakan. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang terdiri dari molekul-molekul gula, hydrogen cyanide, cincin benzene atau aseton (Krebs, 1970), namun linamarin tidak memiliki cincin benzene. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa penyusun vitamin B₁₇. Ada 14 jenis nitrilosida yang tersebar pada lebih dari 1200 spesies. Singkong merupakan sumber nitrilosida tertinggi (linamarin) dibandingkan tanaman lain seperti sorghum, gandum dan millet (Oke 1969, Krebs 1974). Singkong dilaporkan mengandung nitrilosida linamarin antara 225-1830mg/kg (Culbert 1983).



Gambar 4. Beberapa struktur senyawa glukosidase

Penguraian metabolic linamarin oleh beta glukosidase menghasilkan terbentuknya gula, ketone dan cyanide (Gambar 5). Cyanida merupakan agent sitotoksik yang berpotensi membunuh sel dengan jalan menghambat cytochrome oksidase pada rantai transport electron di mitokondria (Saidu, 2004).



Gambar 5. Reaksi Penguraian Linamarin

Parameter Fisiokimia Linamarin

Linamarin [2-(-D-glucopyranosyloxy)-2-methylpropanenitrile] , juga dikenal sebagai phaseolunatin. Rumus molekul linamarin adalah $C_{10}H_{17}O_6$ dengan berat molekul 247.24 g/mol. Komposisi linamarin adalah C 48.58%, H 6.93%, N 5.6% dan O 38.83%. Linamarin larut dalam air dan berwujud bubuk berwarna putih. Linamarin dapat ditemukan pada tanaman yang tergolong Compositae, Leguminosae, Euphorbiaceae, Linaceae and Papaveraceae (Seigler, 1975).

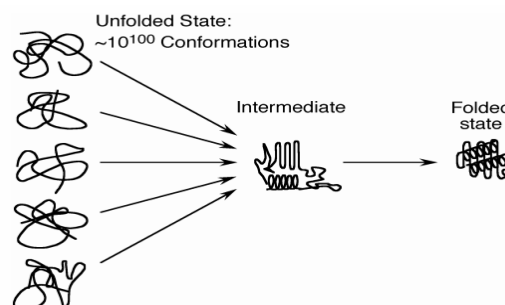
Linamarase

Linamarase, atau beta-D-glucosidase (EC 3.2.1.21), adalah enzim yang ditemukan pada beberapa tanaman termasuk singkong dan kacang (butter bean). Pada tanaman singkong, linamarase terletak pada dinding sel tanaman. Ketika jaringan tanaman dirusak atau dicacah, linamarase akan terekspose dengan linamarin dan lotaustraline sehingga melepaskan senyawa sianida yang bisa berakibat fatal jika dikonsumsi. Pada tubuh manusia, keracunan akut akan cenderung terjadi dibandingkan kematian. Aksi dari enzim digunakan pada berbagai kebudayaan untuk memproses singkong sehingga menjadi bahan yang dapat dikonsumsi manusia. Enzim linamarase akan mengkonversi senyawa yang mengandung sianida menjadi acetone cyanohydrins, yang secara spontan akan terdekomposisi menjadi hydrogen cyanide (HCN). Selanjutnya HCN akan larut dalam air atau dilepaskan ke udara. Selama proses pengolahan singkong, tidak semua sianida dapat dihilangkan. Linamarase diketahui optimum pada pH 5,1 - 6 dan dapat dihambat oleh pH rendah melalui larutan asam.

Aktivitas beberapa enzim diketahui terhambat bila berada dalam lingkungan asam. Hal tersebut juga terjadi pada enzim linamarase. Dalam senyawa asam, aktivitas enzim terhambat karena terjadi penurunan jumlah sisi aktif dari enzim linamarase. Berkurangnya jumlah sisi aktif enzim disebabkan terjadi proses unfolding pada struktur tersier enzim.

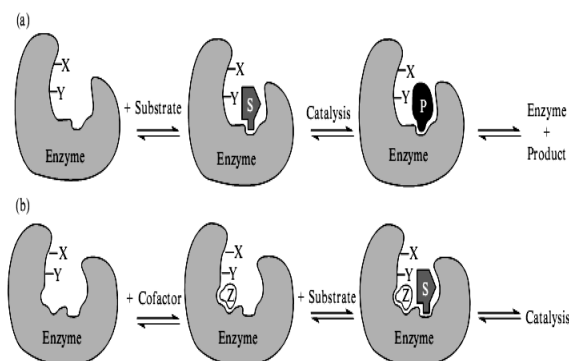
Enzim merupakan suatu molekul raksasa dengan berat molekul yang bervariasi antara 5000 Da-5 juta Da. Enzim termasuk dalam kelompok makromolekul yang lebih besar yakni protein. Enzim terdiri dari rangkaian rantai linear asam-asam amino spesifik. Pada kondisi optimumnya enzim akan mengalami proses folding (Gambar 6). Proses

terbentuknya susunan folding pada enzim merupakan proses spontan yang terjadi dalam hitungan detik (Bugg, 2004).



Gambar 6. Proses Folding

Rangkaian asam amino pada enzim akan membentuk susunan tiga dimensi tertentu yang spesifik pada masing-masing jenis enzim (struktur tersier). Bagian dari struktur tersier enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik enzim disebut sisi aktif. Jumlah sisi aktif dari suatu enzim mencapai 10-20% dari volume total enzim (Bugg 2004). Sisi aktif suatu enzim biasanya berupa suatu celah hidrofilik yang terdiri dari rangkaian rantai asam amino yang akan mengikat substrat (Gambar 7.a) atau mengikat suatu kofaktor (Gambar 7.b) dan mengkatalisis reaksi.



Gambar 7. Sisi aktif enzim

Proses folding pada enzim merupakan proses yang melibatkan masuknya rantai asam amino yang bersifat hidrofobik ke sisi bagian dalam dari enzim dan proses keluar atau bergesernya rantai asam amino yang bersifat hidrofilik ke bagian luar dari susunan tiga dimensi enzim.

Dalam lingkungan yang bersifat hidrofobik seperti dalam solvent organik, proses folding pada enzim linamarase akan terhambat. Hal tersebut diakibatkan pada lingkungan yang bersifat hidrofobik, enzim linamarase akan mengekspos rantai asam yang bersifat hidrofobik sehingga enzim linamarase akan berada pada kondisi *unfolded* atau inaktif (Garrido 2003).

Kesimpulan

Indonesia sebagai penghasil singkong terbesar ketiga didunia berpotensi mengembangkan produk-produk dari tanaman singkong, diantaranya linamarin. Linamarin berpotensi sebagai senyawa anti neoplastik (anti kanker). Linamarin dapat diproduksi melalui proses inaktivasi enzimatis melalui ekstraksi menggunakan larutan asam.

Daftar Pustaka

- Akintonwa, A., Tunwashe, O., & Onifade, A. (1994). Fatal and nonfatal acute poisoning attributed to cassava-based meal. *Acta Hort.*, 375, 285–288.
- Bradbury, J. H., Egan, S. V and Lynch, M.J (1991). Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides. *Journal of Science Food and Agriculture*, 55, 277-290.
- Cooke, R. D (1978). An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Science Food and Agriculture*, 29, 345-352.
- Culbert, M. (1983). What the Medical Establishment Won't Tell You That Could Save Your Life. Virginia Beach: Donning Co In: Griffin, G.E. *World Without Cancer* (1997) 24.
- De Bruijn, G. H. (1973). A study of cyanogenic character of cassava. In: B. Nestel and R. MacIntyre Ed., *chronic cassava toxicity, proceedings of an interdisciplinary workshop*. 29-30 January London, IDRC, Ottawa IDRC-OIOe, 43-48.
- Elias, M., Bala, N. and Sudhakaran, P. R. (1997). Catabolism of linamarin in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Science*, 126, 155-162.
- Haque M.R., (2004) Preparation of Linamarin From Cassava leaves for Use in Cassava Cyanide Kit, *Food Chemistry* 85, 27-29
- King, N. L. R., & Bradbury, J. H. (1995). Bitterness of cassava: identification of a new apiosyl glucoside and other compounds that affect its bitter taste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 223–230.
- Koch, B., Nielsen, V. S., Halkier, B. A., Olsen, C. E. and Moller, B. L. (1992). Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of Benzylglucosinolate. *Archives of Biotechnology and Biosynthesis*, 292, pp141.
- Krebs, E.T. Jr. (1970). The nitrilase (Vitamin B-17): Their nature, occurrence and metabolic significance. *Journal of Applied Nutrition*, 22, 75-86.
- Krebs, E. T. Jr. (1974). The nitrilases in plants and animals in *Vitamin B-17*. M. Culbert New Rochelle, Arlington House. pp 145-164.
- Liancheng, D., Mpoko, B., Birger, L. M., and Barbara, A. H. (1995). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in roots of cassava. *Phytochemistry*, 39 (2), 323-326.
- Mlingi, N. D., Poulter, N. H. and Roseling, H. (1992). An outbreak of acute intoxications from consumption of insufficiently processed cassava in Tanzania. *Nutrition Research*, 12, 677-687.
- Nahrstedt, A. (1987). Recent developments in chemistry, distribution and biology of the cyanogenic glycosides. In: Jackson FLC secondary compounds in plants (Allelochemicals) as promoters of human biological variability. *Annual Review of Anthropology*, 20, 505-544.
- Nambisan, B. and Sundaresan, S. (1994). Distribution of linamarin and its metabolizing enzymes in cassava tissues. *Journal of Science Food Agriculture*, 66, 503-508.
- Peifen, C. J., Lukas, A. M., Alfred, W., Suzanne, P., Martha, A., John, P., Seung, Y and Peter, D. K. (2004). Metacyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 32, 3-5.
- Yeoh, H. H and Truong, V. D. (1993). Quantitative analysis of linamarin in cassava using cassava α -glucosidase electrode. *Journal of Food and Chemistry*, 47, 295-298.
- Yeoh, H. H., Tatsuma, T. and Oyama, N. (1998). Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *Trend in Analytical Chemistry*, 17, 234-240.